

**PCT**ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL  
Oficina InternacionalSOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

|   |  |   |  |
|---|--|---|--|
| (51) Clasificación Internacional de Patentes <sup>6</sup> :<br><b>G01N 33/68</b>  |  | A1  | (11) Número de publicación internacional: <b>WO 98/25147</b>   |
|   |  |   | (43) Fecha de publicación internacional: <b>11 de Junio de 1998 (11.06.98)</b>   |
| (21) Solicitud internacional: <b>PCT/ES97/00296</b>   |  | Felipe [ES/ES]; Universidade de Santiago de Compostela, Departamento de Medicina, Facultade de Medicina, E-15705 Santiago de Compostela (ES). |  |
| (22) Fecha de la presentación internacional: <b>1 de Diciembre de 1997 (01.12.97)</b>   |  |   |  |
| (30) Datos relativos a la prioridad:<br><b>P 9602543 2 de Diciembre de 1996 (02.12.96)</b>  |  | ES  | (81) Estados designados: CA, JP, US, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). |
| (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):<br>UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA [ES/ES]; Praza do Obradoiro, Pazo de San Xerome, E-15705 Santiago de Compostela (ES).  |  | Publicada<br><i>Con informe de búsqueda internacional.</i>  |  |
| (72) Inventores; e<br>(75) Inventores/solicitantes (sólo US): <b>CASABIELL PINTOS, Xestus [ES/ES]; Universidade de Santiago de Compostela, Laboratorio de Endocrinología Molecular, Departamento de Medicina, Facultade de Medicina, E-15705 Santiago de Compostela (ES). PEREZ RODRIGUEZ, Francisco [ES/ES]; Universidade de Santiago de Compostela, Departamento de Medicina, Facultade de Medicina, E-15705 Santiago de Compostela (ES). PEREZ CAMINA, Jesús [ES/ES]; Universidade de Santiago de Compostela, Departamento de Medicina, Facultade de Medicina, E-15705 Santiago de Compostela (ES). CASANUEVA FREIJO,</b>  |  |   |  |
| (54) Title: <b>PROCESS FOR THE QUANTITATIVE ASSAYING OF PROTEINS IN BIOLOGICAL MICROSAMPLES PREPARED IN ELECTROPHORESIS BUFFER</b>  |  |   |  |
| (54) Título: <b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE PROTEINAS EN MICROMUESTRAS BIOLOGICAS PREPARADAS EN TAMPON DE ELECTROFORESIS</b>  |  |   |  |
| (57) Abstract   |  |   |  |
| <p>Process for the quantitative determination of proteins in biological microsamples (0.002 mL) prepared in electrophoresis buffer. The samples are immobilised on chromatography paper and tinted with a Brilliant Blue Coomassie R-250 after removing the electrophoresis buffer by fixing/washing with acid methanol. The samples are then quantified in relation to their optical density by using a digital scanner and integration software. This process provides for the protein assays in aqueous microsamples as well as in samples dissolved directly in electrophoresis buffer which contains substances interfering strongly with other processes for the quantification of proteins. The fast, sensitive and economical process applies to the biomedical investigation and the clinical practice.</p>  |  |   |  |
| (57) Resumen  |  |   |  |
| <p>Procedimiento para la determinación cuantitativa de proteínas en micromuestras (0.002 mL) biológicas preparadas en tampón de electroforesis. Las muestras son inmovilizadas sobre papel de cromatografía, y teñidas con una solución de Coomassie Brilliant Blue R-250 tras la eliminación del tampón de electroforesis por fijación/lavado con metanol ácido. Las muestras son seguidamente cuantificadas en base a su densidad óptica utilizando un escáner digital y un software de integración. Este método permite realizar mediciones de proteína en micromuestras acuosas, así como en muestras disueltas directamente en tampón de electroforesis, el cual contiene sustancias que interfieren fuertemente con otros métodos de cuantificación de proteínas. El procedimiento rápido, sensible y económico es de aplicación en la investigación biomédica y la práctica clínica.</p> |  |   |  |

**UNICAMENTE PARA INFORMACION**

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

|    |                          |    |                      |    |                          |    |                           |
|----|--------------------------|----|----------------------|----|--------------------------|----|---------------------------|
| AL | Albania                  | ES | España               | LS | Lesotho                  | SI | Eslovenia                 |
| AM | Armenia                  | FI | Finlandia            | LT | Lituania                 | SK | Eslovaquia                |
| AT | Austria                  | FR | Francia              | LU | Luxemburgo               | SN | Senegal                   |
| AU | Australia                | GA | Gabón                | LV | Letonia                  | SZ | Swazilandia               |
| AZ | Azerbaiyán               | GB | Reino Unido          | MC | Mónaco                   | TD | Chad                      |
| BA | Bosnia y Herzegovina     | GE | Georgia              | MD | República de Moldova     | TG | Togo                      |
| BB | Barbados                 | GH | Ghana                | MG | Madagascar               | TJ | Tayikistán                |
| BE | Bélgica                  | GN | Guinea               | MK | ExRepública Yugoslava de | TM | Turkmenistán              |
| BF | Burkina Faso             | GR | Grecia               | ME | Macedonia                | TR | Turquía                   |
| BG | Bulgaria                 | HU | Hungría              | ML | Mali                     | TT | Trinidad y Tabago         |
| BJ | Benín                    | IE | Irlanda              | MN | Mongolia                 | UA | Ucrania                   |
| BR | Brasil                   | IL | Israel               | MR | Mauritania               | UG | Uganda                    |
| BY | Belarús                  | IS | Islandia             | MW | Malawi                   | US | Estados Unidos de América |
| CA | Canadá                   | IT | Italia               | MX | México                   | UZ | Uzbekistán                |
| CF | República Centroafricana | JP | Japón                | NE | Níger                    | VN | Viet Nam                  |
| CG | Congo                    | KE | Kenya                | NL | Países Bajos             | YU | Yugoslavia                |
| CH | Suiza                    | KG | Kirguistán           | NO | Noruega                  | ZW | Zimbabwe                  |
| CI | Côte d'Ivoire            | KP | República Popular    | NZ | Nueva Zelanda            |    |                           |
| CM | Camerún                  |    | Democrática de Corea | PL | Polonia                  |    |                           |
| CN | China                    | KR | República de Corea   | PT | Portugal                 |    |                           |
| CU | Cuba                     | KZ | Kazakstán            | RO | Rumania                  |    |                           |
| CZ | República Checa          | LC | Santa Lucía          | RU | Federación de Rusia      |    |                           |
| DE | Alemania                 | LI | Liechtenstein        | SD | Sudán                    |    |                           |
| DK | Dinamarca                | LK | Sri Lanka            | SE | Suecia                   |    |                           |
| EE | Estonia                  | LR | Liberia              | SG | Singapur                 |    |                           |

**TITULO**

Procedimiento para la determinación cuantitativa de proteínas en micromuestras biológicas preparadas en tampón de electroforesis.

5

**DESCRIPCION**

Procedimiento para la determinación cuantitativa de proteínas en micromuestras biológicas preparadas en tampón de electroforesis.

El procedimiento para la determinación de la concentración de soluciones proteicas está basado en la adsorción de micromuestras a un soporte sólido, seguida de tinción con 10 Azul Brillante de Coomassie R-250 (Coomassie Brilliant Blue R-250, Color Index 42660) y cuantificación densitométrica. Esta técnica es sensible, de fácil realización y mínimo coste, presentando la particularidad de ser utilizable cuando las muestras han sido disueltas con dodecilsulfato de sodio (SDS: sodium dodecyl sulfate) o tampón de electroforesis (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8; 2 % SDS; 5 % beta-mercptoetanol; 10 % glicerol; 0.002 % azul de bromofenol) (Laemmli UK: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685. 1970*).

La determinación de proteínas en los laboratorios de investigación clínica y biomédica se realiza en general mediante espectrofotometría UV-V, bien analizando la absorbancia a 280 nm (A280) de la solución proteica, o bien mediante pruebas 20 colorimétricas, de las cuales las más empleadas son las del biuret, el ensayo de Lowry, el ensayo de Bradford y el ensayo del BCA.

La medición de la A280 (Warburg O, Christina W: *Isolierung und Kristallisation des Gaerungsferments Enolase. Biochem. Z. 310: 384-421. 1941*) no constituye una medición directa de la cantidad de proteína presente, sino que refleja la abundancia de 25 residuos aromáticos en la cadena polipeptídica, por lo que el coeficiente de extinción molar de cada proteína varía entre amplios márgenes. Su uso se restringe fundamentalmente a la monitorización de fracciones en técnicas cromatográficas, y su rango de sensibilidad abarca de 0.2 a 2 mg/mL. Su principal ventaja es la de ser un método no destructivo.

La reacción del biuret para la determinación de proteínas fue uno de los primeros 30 métodos desarrollados para el análisis colorimétrico de las mismas (Gornall AG, Bardawill CJ, David MM: *Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol.*

*Chem. 177: 751-766. 1949*) y se usa todavía hoy extensamente en aplicaciones que requieren rapidez pero no una elevada sensibilidad. Se basa en el complejamiento del cobre en una disolución alcalina con el enlace peptídico de las proteínas, y también con los residuos de tirosina. Su principal inconveniente, es el gran número de sustancias que 5 interfieren con la misma, entre ellas numerosos tampones utilizados frecuentemente en biología (Tris, Hepes, Pipes, Mes, etc.).

El ensayo de Lowry (*Lowry OH, Rosebrough NJ, Far LA, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275. 1951*) ha sido la técnica más empleada para la determinación de proteínas hasta hace relativamente poco 10 tiempo. Es una ampliación del procedimiento del biuret en la que se forma un complejo de cobre-proteína en solución alcalina, que a su vez reduce un reactivo fosfomolibdico-fosfotungstico para dar un color azul intenso. A pesar de ser una técnica sensible (0.005 a 0.1 mg/mL) y muy específica, presenta varias desventajas que la han desplazado: Los 15 reactivos utilizados son inestables; la cinética de la reacción es lenta, y numerosas sustancias interfieren con la reacción.

El ensayo del BCA (bicinchoninic acid assay) (*Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150: 76-85. 1985*) es una variante del método de Lowry desarrollada recientemente, más sencilla de realizar y 20 menos sujeta a interferencias. En ella se utiliza el BCA como un sistema indicador para monitorizar el ion  $Cu^{1+}$  producido durante la reacción del biuret. Presenta un rango de sensibilidad de 0.01 a 1.2 mg/mL, pero la cinética de la reacción es lenta, requiriéndose incubaciones relativamente largas a temperaturas de hasta 60 °C para lograr la máxima sensibilidad.

25 El ensayo de Bradford (*Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254. 1975*) es un método rápido para la determinación de la concentración de proteínas. Su rango de sensibilidad va de 0.1 a 2 mg/mL (en su formulación estándar) o de 0.01 a 0.2 mg/mL (formulación micrométodo). La base de la 30 técnica es la formación de un complejo insoluble azulado entre el colorante y la proteína que es cuantificado posteriormente en base a su absorbancia a 595 nm.

La posibilidad de determinar la concentración de proteína en micromuestras con las técnicas espectrofotométricas mencionadas, está condicionada al volumen mínimo necesario para realizar la lectura de la absorbancia, que es de 1.5 mL para las cubetas estándar, 0.5 mL para las cubetas semimicro, y 0.1 mL para las microcubetas (Tabla I).

5 Estas últimas no son sin embargo accesorios estándar incluidos con los espectrofotómetros más utilizados, debiendo ser adquiridas por separado y a un elevado coste.

---

**TABLA I.- CANTIDAD MINIMA DE MUESTRA REQUERIDA PARA LECTURA**  
(mL)

|                 | Relación muestra:reactivo | Cubeta estándar (1.5 mL) | Cubeta semimicro (0.5 mL) | Cubeta micro (0.1 mL) |
|-----------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|
| <b>A280</b>     | -                         | 1.500                    | 0.500                     | 0.100                 |
| <b>Biuret</b>   | 5:2                       | 1.000                    | 0.350                     | 0.070                 |
| <b>Lowry</b>    | 1:5                       | 0.300                    | 0.100                     | 0.020                 |
| <b>BCA</b>      | 1:20                      | 0.080                    | 0.025                     | 0.005                 |
| <b>Bradford</b> | 1:50                      | 0.030                    | 0.010                     | 0.002                 |

10

De los datos de la Tabla I se deduce que en el caso de utilizar microcubetas, son necesarios 0.002 mL en el caso del ensayo de Bradford y 0.005 mL en el caso del ensayo del BCA. En la práctica normal (cubeta semimicro) las cantidades consumidas en la mayoría de los laboratorios para realizar la medida de la concentración de proteína son de 15 0.010 y 0.025 mL, respectivamente.

La medición de la concentración de proteínas en muestras de pequeño volumen es por ello un problema práctico muy frecuente. Ninguna de las técnicas disponibles es aplicable directamente a situaciones en las que la cantidad de muestra disponible sea

limitante y especialmente cuando ésta contenga sustancias que interfieran con los métodos habituales de cuantificación de proteínas. Ello ocurre muy en particular cuando se usan técnicas de electroforesis en un laboratorio biomédico.

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS es una de las 5 técnicas analíticas más potentes y de uso más difundido para la resolución de mezclas proteicas complejas (*Laemmli UK, op. cit.*). Esta técnica ofrece un gran poder resolutivo, es fácil de realizar, reproducible, económica, y requiere cantidades mínimas de muestra (0.001 a 0.1 mL), por lo que se ha convertido en una técnica de rutina en los laboratorios de investigación clínica y básica. Su uso requiere conocer previamente la concentración de 10 proteína en las muestras para: (1) evitar la sobrecarga del gel, con la consiguiente pérdida de resolución que conlleva; (2) asegurar la reproducibilidad de la técnica; y (3) permitir la obtención de datos cuantitativos y la comparación entre muestras problema.

En muchas circunstancias, el volumen total de muestra es mínimo, por lo que no se dispone de cantidades suficientes para realizar una determinación de la concentración de 15 proteína en paralelo por métodos espectrofotométricos convencionales. Además, en caso de muestras muy pequeñas, lo habitual es solubilizarlas directamente en tampón de electroforesis (especialmente si la técnica ha requerido una precipitación previa de la proteína mediante ácido tricloroacético o acetona, o por inmunoprecipitación con anticuerpos específicos). Este tampón (*Laemmli, op. cit*) contiene elevadas cantidades de 20 SDS (típicamente un 2 % p/v) como agente solubilizador y desnaturizante; un agente reductor como el mercaptoetanol (5 % v/v), y azul de bromofenol (0.002 % p/v) como colorante trazador. Estas sustancias, en las cantidades mencionadas, interfieren seriamente con todos los métodos habituales de determinación espectrofotométrica de proteínas (A280, reacción del biuret, reacción de Bradford, reacción de Lowry, reacción del BCA), 25 por lo que sería de extremada utilidad un método práctico para determinar la concentración de proteína en muestras así preparadas.

Se han propuesto varios métodos para tratar de resolver este problema, pero la mayoría de los mismos son relativamente poco sensibles y/o laboriosos. Así, el método de Schaffner (*Schaffner W, Weissmann C: A rapid, sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution. Anal. Biochem. 56: 502-514. 1973*) requiere la precipitación previa de las proteínas con ácido tricloroacético, tras lo cual el material

precipitado es recogido por filtración sobre filtros Millipore. Las proteínas son reveladas en los filtros por tinción con AmidoBlack 10B, colorante que es seguidamente eluido mediante etanol en medio básico, y cuantificado por espectrofotometría. A pesar de permitir la medición de micromuestras en presencia de SDS, resulta demasiado laborioso 5 como método de aplicación general. Dos modificaciones de este método (*Sheffield JB, Graff D, Li HP: A solid-phase method for the quantitation of protein in the presence of sodium dodecyl sulfate and other interfering substances. Anal. Biochem. 166: 49-54. 1987*); (*Henkel AW, Bieger SC: Quantification of proteins dissolved in an electrophoresis sample buffer. Anal. Biochem. 223: 329-331. 1994*) se basan en la aplicación directa de las 10 muestras a una membrana de nitrocelulosa, eliminándose los pasos de precipitación con ácido tricloroacético y filtración. Las muestras adsorbidas a la membrana son posteriormente teñidas con AmidoBlack 10B, que es a continuación eluido y cuantificado espectrofotométricamente. El procedimiento resulta menos laborioso, pero se requiere todavía la elución del colorante para la cuantificación de la proteína. Este problema es 15 obviado en un procedimiento similar (*Sportsman JR, Elder JH: A microanalytical protein assay using laser densitometry. Anal. Biochem. 139: 298-300. 1983*), en el que la cuantificación del colorante se realiza mediante un densímetro láser. Esta última técnica resulta sencilla de realizar y permite la cuantificación rápida y fiable de proteínas en el rango 0.1-1.0 mg/mL, usando muestras de 0.0025 mL (0.25 a 2.5 µg de proteína). Su 20 principal problema lo constituye el soporte utilizado, la nitrocelulosa, quebradiza y poco manejable, y cuya capacidad de ligazón de proteínas se ve reducida por la presencia de SDS, por lo que la concentración utilizada se ha limitado al 1 % p/v.

El fundamento de la invención que aquí se describe es un procedimiento utilizado 25 frecuentemente para la valoración semicuantitativa de proteínas (*Coluccio LM, Breitscher A: Calcium-regulated cooperative binding of the microvillar 110K-calmodulin complex to F-actin. J. Cell. Biol. 105: 325-333. 1987*) en fracciones cromatográficas. En este procedimiento las muestras (0.003 mL) son aplicadas directamente sobre una tira de papel de cromatografía, tras lo cual son teñidas simplemente con el colorante estándar utilizado 30 para la tinción de los geles de electroforesis (Azul brillante de Coomassie R-250 en metanol-acético), y destañidas con la solución de destinción estándar. Este procedimiento ha sido modificado para permitir la utilización directa de muestras preparadas en tampón

de electroforesis mediante la adición de un paso de fijación-lavado previo a la tinción, y se ha hecho cuantitativo mediante evaluación de la densidad óptica de las manchas proteicas en imágenes digitalizadas por medio de un escáner de sobremesa. Estos aparatos constituyen en la actualidad un accesorio ampliamente difundido en todos los laboratorios 5 y centros de investigación debido a su precio reducido (menos de un 10 % del coste de un videodensitómetro o un densitómetro láser) y buenas prestaciones. Su utilización, acoplada a un software adecuado de análisis de imagen, permite mediciones precisas y fiables de densidad óptica en muestras digitalizadas (*Shea TB: An inexpensive densitometric analysis system using a Macintosh™ computer and a desktop scanner. BioTechniques, 16: 1126-1128. 1994*); (*Velleman SG: Quantifying immunoblots with a digital scanner. BioTechniques, 18: 1056-1058. 1995*).

La presente invención resuelve el problema técnico de la determinación de la cantidad de proteína en muestras de pequeño tamaño (0.002 mL), por lo que proponemos su uso como ensayo de proteínas de aplicación general para micromuestras. Muy en 15 especial, resuelve el problema de las muestras solubilizadas previamente con SDS o tampón de electroforesis. Esta técnica es muy sencilla, rápida, reproducible, y requiere un equipamiento de bajo coste, disponible en la gran mayoría de los laboratorios clínicos y de investigación. Permite la determinación de la concentración de proteína en el rango 0.1-1 mg/mL, un rango similar al abarcado por el ensayo de Bradford, el más utilizado en la 20 actualidad, aunque el pequeño volumen requerido permite la detección de cantidades de proteína tan pequeñas como 0.2-2 µg. Por último, la técnica no resulta afectada por la presencia de SDS hasta un 2 % p/v, o tampón de electroforesis.

El procedimiento se basa en el descrito originalmente por Coluccio y Bretscher en 1987 (op. cit.), que es únicamente semicuantitativo, modificado para eliminar la 25 interferencia por SDS, beta-mercaptoetanol y azul de bromofenol (componentes del tampón que se utiliza habitualmente para disolver las muestras que van a ser analizadas por electroforesis sobre gel de poliacrilamida), y adaptado para la determinación cuantitativa.

#### MODO DE REALIZACION:

30

Material:

- 1.- Papel de filtro de calidad, grueso (BioRad, o Whatman 3MM Chr). Manipularlo siempre con guantes para no contaminarlo con proteínas cutáneas.
- 2.- Solución patrón de proteína: Albúmina Sérica Bovina (BSA), solución a 1 mg/mL en agua destilada (si se van a medir muestras acuosas) o en tampón de electroforesis (para muestras disueltas en el mismo). Disponible comercialmente de varias fuentes, o preparada en el laboratorio a partir de una disolución de albúmina bovina a 10 mg/mL (absorbancia a 280 nm de 6.6).
- 3.- Solución de tinción: Azul Brillante de Coomassie R-250 (SERVA blue R) 1 mg/mL, disuelto en Metanol:Acético:Agua (10:4:10), y filtrado a través de una membrana de 0.44 mm.
- 4.- Tampón de electroforesis de Laemmli (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8; 2 % SDS; 5 % beta-mercaptoetanol; 10 % glicerol; 0.002 % azul de bromofenol):
- 5.- Solución de destinción: 12.5 % Metanol-10 % Acético.
- 6.- Secador: Lámpara de infrarrojos o secador de pelo manual.
- 7.- Escáner: Cualquier escáner de oficina capaz de trabajar a 8 bits (256 grises) y con una resolución de al menos 150 puntos por pulgada (En nuestro caso, Apple™ Color One).
- 8.- Ordenador personal: Cualquier ordenador capaz de controlar el escáner (Macintosh™ o PC compatible. En nuestro caso un Macintosh™ LC 475).
- 9.- Software de Integración: Cualquier paquete de software capaz de realizar lecturas de densidad óptica integrada a partir de la imagen generada por el escáner. En nuestro caso hemos utilizado NIH Image, un programa de dominio público para análisis digital de imagen en ordenadores Apple Macintosh™, elaborado por Wayne Rasband (U.S. National Institutes of Health) y disponible sin coste a través de Internet (por ftp al servidor <zippy.nimh.nih.gov>) o en diskette (National Technical Information Service, Springfield, Virginia, ítem número PB93-504868). Los mismos resultados pueden obtenerse con otros muchos paquetes de software, entre ellos Adobe Photoshop™, disponible para ordenadores Macintosh™ y PC-compatibles.

## MÉTODO:

5

Preparar una curva estándar a partir del patrón de proteína. La utilizada por nosotros se prepara como sigue:

## MUESTRAS ACUOSAS

| Concentración<br>(mg/mL) | Estándar 1 mg/mL<br>(acuoso) | Agua |
|--------------------------|------------------------------|------|
| 0.00                     | 0                            | 100  |
| 0.10                     | 10                           | 90   |
| 0.25                     | 25                           | 75   |
| 0.50                     | 50                           | 50   |
| 0.75                     | 75                           | 25   |
| 1.00                     | 100                          | 0    |

10

## MUESTRAS PREPARADAS EN TAMPON DE ELECTROFORESIS

| Concentración<br>(mg/mL) | Estándar 1 mg/mL<br>(en tampón) | Tampón de<br>electroforesis |
|--------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| 0.00                     | 0                               | 100                         |
| 0.10                     | 10                              | 90                          |
| 0.25                     | 25                              | 75                          |
| 0.50                     | 50                              | 50                          |
| 0.75                     | 75                              | 25                          |
| 1.00                     | 100                             | 0                           |

5 Pipetear 0.002 mL de cada uno de los puntos de la curva sobre el papel de filtro, espaciados regularmente, cuidando de no arañar la superficie del papel con la punta de la micropipeta. Podemos ayudarnos de un retículo de 1 x 1 cm dibujado previamente sobre el papel con un lápiz blando, depositando cada muestra cuidadosamente en el centro de los cuadrados.

10 Pipetear 0.002 mL de cada muestra problema sobre el papel, de la misma manera que los patrones. Si la concentración inicial es totalmente desconocida, pueden pipetearse varias diluciones diferentes de cada muestra.

Secar completamente el papel con la lámpara de infrarrojos o el secador. Alternativamente, dejar secar al aire, resguardándolo del polvo.

15 Fijación/lavado: Colocar el papel de filtro, una vez seco, en una cubeta con solución de destinción. Incubar con agitación suave hasta que el azul de bromofenol que contienen las muestras desaparezca completamente. Si ninguna de las muestras a analizar contiene tampón de electroforesis, este paso puede eliminarse, procediéndose directamente desde el secado a la tinción.

Tinción: Retirar la solución de destinción y sustituirla por solución de tinción. Incubar 15 minutos, con agitación suave.

20 Destinción: Eliminar la solución de tinción (que puede ser reciclada varias veces) y sustituirla por solución de destinción. Incubar con agitación suave y cambiarla cada 15 minutos hasta obtener un fondo claro y uniforme.

Secado: Con la lámpara de infrarrojos, el secador, o en estufa. Alternativamente, dejar secar al aire en lugar resguardado del polvo.

25 Digitalización: De acuerdo con las instrucciones que acompañan al escáner, a 8 bits (256 grises) y 150 puntos por pulgada. Grabar la imagen resultante en un formato compatible con el software de integración (en general, en formato *TIFF -Tag Image File Format-*). No utilizar formatos que resulten en compresión con pérdida de datos, como *JPEG*).

30 Cuantificación: La metodología concreta dependerá del software utilizado. En general, definir una región de tamaño ligeramente superior al de la mancha de mayor

tamaño, y utilizarla para tomar lecturas de densidad óptica de cada uno de los estándares y las muestras. Graficar la curva estándar y extrapolar la concentración de proteína de las muestras problemas. El ensayo es lineal para la BSA en el rango 0.1-1 mg/mL tanto en muestras acuosas como en muestras preparadas en tampón de electroforesis. Es decir, 5 aproximadamente el mismo rango que abarca el ensayo estándar de Bradford. Se obtienen resultados similares para otras proteínas, como amilasa, alcohol deshidrogenasa (ADH) y citocromo C (Citocr. C). Los resultados obtenidos para varias proteínas en solución acuosa se reflejan en la Tabla II. La Tabla III recoge los resultados para las mismas proteínas disueltas en tampón de electroforesis. En ambos casos se han realizado 14 determinaciones 10 para cada una de las proteínas ( $n = 14$ ). Los resultados obtenidos para la BSA se muestran gráficamente en la Figura 1 (en solución acuosa) y en la Figura 2 (en buffer de electroforesis), como las medias y desviaciones estándar de las densidades ópticas obtenidas (eje Y) para cada concentración de proteína (eje X).

15

TABLA II.- Concentración vs. densidad óptica para varias proteínas en solución

acuosa

(media  $\pm$  desviación estándar,  $n=14$ )

|       | D E N S I D A D O P T I C A |      |         |      |                       |      |             |      |
|-------|-----------------------------|------|---------|------|-----------------------|------|-------------|------|
|       | BSA                         |      | AMILASA |      | ALCOHOL<br>DESHIDROG. |      | CITOCROMO C |      |
| mg/mL | Media                       | D.E. | Media   | D.E. | Media                 | D.E. | Media       | D.E. |
| 0.00  | 0.02                        | 0.02 | 0.02    | 0.01 | 0.02                  | 0.02 | 0.02        | 0.03 |
| 0.05  | 0.05                        | 0.01 | 0.04    | 0.02 | 0.02                  | 0.02 | 0.19        | 0.03 |
| 0.10  | 0.15                        | 0.02 | 0.09    | 0.02 | 0.03                  | 0.02 | 0.30        | 0.04 |
| 0.25  | 0.33                        | 0.03 | 0.25    | 0.03 | 0.15                  | 0.05 | 0.56        | 0.09 |
| 0.50  | 0.54                        | 0.07 | 0.48    | 0.05 | 0.33                  | 0.06 | 0.86        | 0.12 |
| 0.75  | 0.74                        | 0.03 | 0.71    | 0.06 | 0.50                  | 0.11 | 0.99        | 0.14 |
| 1.00  | 0.95                        | 0.04 | 0.83    | 0.05 | 0.55                  | 0.11 | 1.14        | 0.18 |

**TABLA III.- Concentración vs. densidad óptica para varias proteínas en tampón de electroforesis**  
**(media ± desviación estándar, n=14)**

|       | D E N S I D A D O P T I C A |      |         |      |                       |      |             |      |
|-------|-----------------------------|------|---------|------|-----------------------|------|-------------|------|
|       | BSA                         |      | AMILASA |      | ALCOHOL<br>DESHIDROG. |      | CITOCROMO C |      |
| mg/mL | Media                       | D.E. | Media   | D.E. | Media                 | D.E. | Media       | D.E. |
| 0.00  | 0.03                        | 0.04 | 0.03    | 0.03 | 0.03                  | 0.03 | 0.04        | 0.04 |
| 0.05  | 0.05                        | 0.03 | 0.04    | 0.04 | 0.06                  | 0.04 | 0.16        | 0.07 |
| 0.10  | 0.13                        | 0.06 | 0.09    | 0.05 | 0.13                  | 0.06 | 0.33        | 0.13 |
| 0.25  | 0.40                        | 0.08 | 0.32    | 0.08 | 0.40                  | 0.08 | 0.71        | 0.17 |
| 0.50  | 0.70                        | 0.10 | 0.63    | 0.11 | 0.66                  | 0.11 | 1.08        | 0.15 |
| 0.75  | 0.92                        | 0.13 | 0.83    | 0.10 | 0.88                  | 0.08 | 1.27        | 0.12 |
| 1.00  | 1.07                        | 0.14 | 1.00    | 0.12 | 1.00                  | 0.09 | 1.42        | 0.13 |

5      Posibilidades de aplicación industrial:

Es una técnica de utilidad general como método para microdeterminación de proteínas en muestras de pequeño volumen. Es de destacar su utilidad en casos de muestras que contengan sustancias que interfieran con los métodos estándar de determinación de proteínas (concentración elevada de sales, presencia de detergentes o colorantes), ya que éstas son eliminadas durante la fijación/lavado en metanol ácido. Resulta especialmente aplicable en laboratorios clínicos y de investigación biomédica, al permitir evaluar de un modo rápido y sencillo la concentración de proteína de las muestras previamente a su caracterización electroforética.

## REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para la determinación cuantitativa de proteínas en micromuestras biológicas preparadas en tampón de electroforesis, caracterizado por la evaluación de la densidad óptica de las mismas tras: i) adsorción a papel cromatográfico de las muestras problema; ii) fijación/lavado en metanol ácido; iii) tinción con azul brillante de Coomassie R-250; iv) digitalización de la imagen obtenida con un escáner de sobremesa y v) análisis de la misma con un software de integración y un ordenador personal.

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 9999

1/2

**Densidad  
óptica**

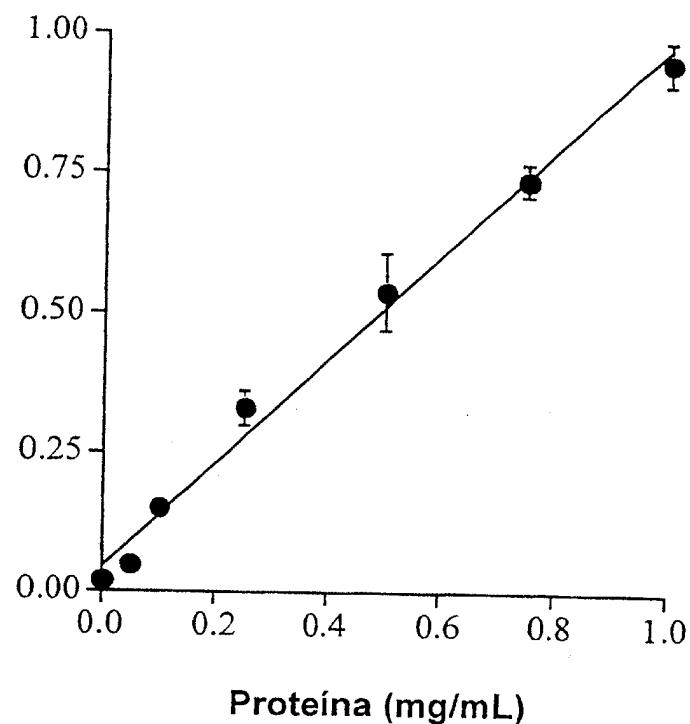


Figura 1

**Densidad  
óptica**

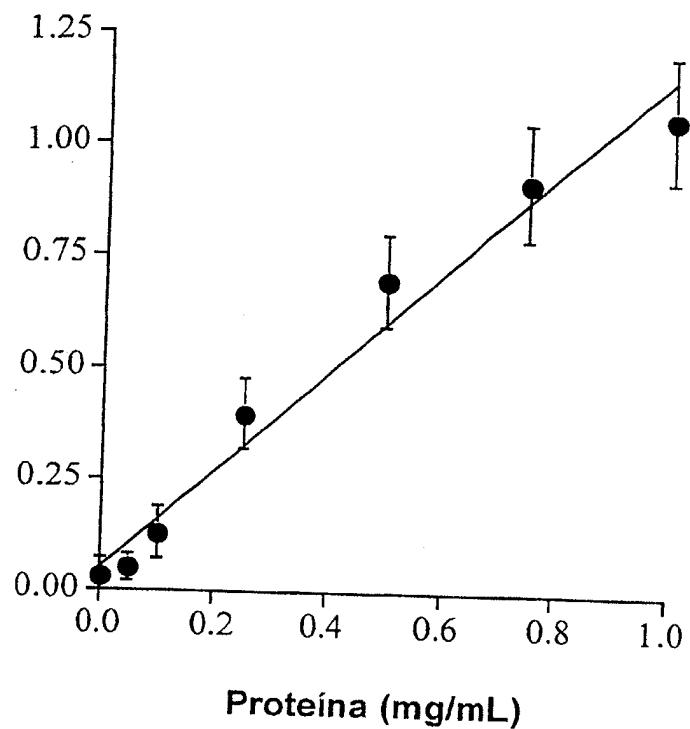


Figura 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 97/00296

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6: G01N 33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6: G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X         | SHEA, T.B. "An Inexpensive Densitometric Analysis System Using a Macintosh <sup>TM</sup> Computer and Desktop Scanner". BIOTECHNIQUES. 1994. Vol. 16, No 6, pages 1126-1128.<br>The whole document | 1-3                   |
| X         | KENDRICK, N.C. et al. "Optimization of an HP Scanjet for Quantification of Protein Electrophoresis Gels". ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. 1994. Vol. 219, pages 297-304.<br>The whole document            | 1-3                   |

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

|   |  |
|---|--|
| Date of the actual completion of the international search<br><br>10 March 1998 (10.03.98) | Date of mailing of the international search report<br><br>18 March 1998 (18.03.98) |
| Name and mailing address of the ISA/<br><br>S.P.T.O.                                      | Authorized officer   |

Facsimile No.

Telephone No.

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº  
PCT/ES 97/00296

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP<sup>6</sup> G01N 33/68

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)  
CIP<sup>6</sup> G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes   | Relevante para las reivindicaciones nº |
|------------|--|--|
| X          | SHEA, T.B. "An Inexpensive Densitometric Analysis System Using a Macintosh™ Computer and a Desktop Scanner". BIOTECHNIQUES. 1994. Vol. 16, No 6, páginas 1126-1128.<br>Todo el documento | 1-3                                    |
| X          | KENDRICK, N.C. et al. "Optimization of an HP Scanjet for Quantification of Protein Electrophoresis Gels". ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. 1994. Vol. 219, pág. 297-304.<br>Todo el documento    | 1-3                                    |

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

### \* Categorías especiales de documentos citados:

- "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.
- "E" documento anterior aunque publicado en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.
- "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o qué se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad, que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro o otros documentos de la misma naturaleza, resultando dicha combinación evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

|   |   |
|---|---|
| Fecha en que se ha concluido la búsqueda internacional.<br>10 Marzo 1998 (10.03.98)   | Fecha de expedición del Informe de Búsqueda Internacional<br>18 MAR 1998 (18.03.98) |
| Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la Búsqueda Internacional<br>C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.<br>nº de fax +34 1 3495304 | Funcionario autorizado<br>M. NOVOA SANJURJO<br>nº de teléfono +34 1 3495552         |